

혼합폐기물 및 폴리우레탄 담체를 충전한 연속회분식공정을 이용한 생물학적 수소생산

이정열^{1,2}, 위대현¹, 조경숙^{1*}

¹Global Top 5 Research Program, 이화여자대학교 환경공학과

²고려대학교 건축사회환경공학부

Received: April 1, 2014 / Revised: June 2, 2014 / Accepted: July 14, 2014

Biological Hydrogen Production from Mixed Waste in a Polyurethane Foam-sequencing Batch Reactor

Jung-Yeol Lee^{1,2}, Daehyun Wee¹, and Kyung-Suk Cho^{1,2*}

¹Global Top 5 Research Program, Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Republic of Korea

²School of Civil, Environmental and Architectural Engineering, Seoul 136-701, Republic of Korea

This study investigated the effects of polyurethane foam on continuous hydrogen production from mixed wastes. Molasses was co-fermented with non-pretreated sewage sludge in a sequencing batch reactor. The results indicated that the addition of polyurethane foams as a microbial carrier in the reactor mitigated biomass loss at HRT 12 h, while most of the biomass was washed out during the operation period with no carrier. There was a stable hydrogen production rate of 0.4 L-H₂/l/d in the carrier-sequencing batch reactor. Suspended biomass in the carrier-reactor indicated it possessed the highest specific hydrogen production rate (241 ± 4 ml-H₂/g VSS/d) when compared to that of biomass on the surface (133 ± 10 ml-H₂/g VSS/d) or inner carrier (95 ± 14 ml-H₂/g VSS/d).

Keywords: Co-digestion, hydrogen production, polyurethane foam, sequencing batch reactor

유기성폐기물은 생물학적 발효를 통해 수소와 메탄 등의 바이오가스를 생산할 수 있는 중요한 자원이다. 특히, 수소는 단위 질량당 에너지 함량이 높고, 연소 후 이산화탄소 등의 온실가스를 배출하지 않으므로 청정에너지 또는 화석연료를 대체하는 신에너지원으로 각광받고 있다.

발효에 의한 생물학적 수소생산은 주로 환원당을 함유하는 탄수화물계 폐기물을 이용하는 것이 유리하지만, 지속적인 수소생산을 달성하기 위해서는 원료가 되는 폐기물이 질소, 인 등의 영양염류를 충분히 포함해야 한다[3, 4, 12, 16]. 수소생성미생물이 시스템 내에서 지속적으로 성장하기 위해서는 필수 영양성분의 꾸준한 공급이 필요하기 때문이다. 따라서, 다양한 폐기물의 발생 및 처리에 대한 필요성과 더불어

어 지속적인 수소생산을 달성하기 위해 혼합폐기물을 대상으로 수소를 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다[10, 11, 13, 19].

수소생산효율을 높이기 위해 시스템의 수리학적체류시간(Hydraulic retention time, HRT)을 낮춤으로써, 유입기질부하량을 증대시키는 연구가 많이 진행되었다. 하지만, 미생물 유실로 인해 오히려 효율이 떨어지는 사례가 종종 발생하였다. 이 문제를 해결하기 위해 담체 및 자가고정기술 등을 이용하여 수소생성관련 미생물을 시스템 내에 안정적으로 확보하는 방안이 강구되었다[5, 9]. 완전혼합반응조(Completed stirred tank reactor, CSTR) 후단에 침전조를 별도로 설치하는 경우, 현장 적용 시, 넓은 부지를 요구할 뿐 아니라, 슬러지 반송 및 유지관리에 대한 애로사항을 유발할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 소규모 수처리 시스템에서 별도의 침전조를 두지 않고, 유입부하변동에 상대적으로 대응이 유리한 연속회분식공정(Sequencing batch reactor, SBR)을 수소생산시스템(Hydrogen SBR, HSBP)에 적용하기도 하

*Corresponding author

Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

였다[6, 15]. SBR은 하나의 반응조에서 기질 유입, 반응, 침전 및 배출 등의 순서를 반복적으로 실시한다. 하지만, 수소생성과정에서 발생가스로 말미암아 침전효율이 저하되고, 완벽한 고액분리를 위해 반응시간 대비, 침전시간을 상당히 길게 운전하는 경향이 있다[2, 17]. 따라서, 본 연구에서는 담체를 HSBR 반응조에 넣어 미생물을 고정하여 시스템 내 수소생성미생물의 유실을 방지하고, 고액분리에 의한 침전율을 높이는 연구를 실시하였다(Media-HSBR (M-HSBR)). 한편, 수소생성미생물은 상대적으로 높은 성장속도를 유지하기 때문에 반응조 내에서 고정화된 미생물 외에 벌크용액 내에서 부유하고 있는 미생물의 특성을 동시에 조사하는 것이 중요하다. 따라서, 부착미생물에 대한 수소생산특성만 다른 기존 연구와 달리, 본 연구에서는 시스템 내에서 부착미생물 외에 부유미생물에 대한 수소발생에 대한 기여율 조사를 처음으로 시도하였다.

국내 식품가공회사(C사) 및 J 하수처리장에서 당밀폐수 및 하수슬러지를 각각 제공받아 유입기질로 사용하였다. 당밀폐수 원수의 TCOD, SCOD, TS, VS, T-N 농도는 각각 128,400 mg/l, 119,200 mg/l, 89,700 mg/l, 86,200 mg/l 및 30 mg/l이고, 하수슬러지 원수의 TCOD, SCOD, TS, VS, T-N 농도는 각각 17,800 mg/l, 120 mg/l, 44,000 mg/l, 32,200 mg/l 및 1,800 mg/l이었다. 유입폐기물은 선행연구를 통해 얻은 최적 희석비(13.3배) 및 혼합비율(당밀 : 하수슬러지 = 8 : 1, v/v)를 적용하여 사용하였다. 구체적으로 당밀 2 L, 하수슬러지 0.25 L를 20 L 용기에 넣고, 20분간 질소로 퍼징한 수돗물로 나머지 공간을 채웠다. 식종슬러지는 본 실험실에서 이미 가동 중인 수소생성반응조(CSTR) 내 바이오매스(0.2 L)와 열처리한 하수처리장 소화조 슬러지 0.2 L를 혼합하여 이용하였다.

반응조 내경 0.08 m, 높이 0.3 m이며, 유효용적 1 L인 원통형의 아크릴 반응조를 제작하였다. 반응조에 식종슬러지 0.4 L를 접종하고 나머지 공간에는 유입기질인 혼합폐기물(당밀/열처리 하수슬러지)을 채웠다. 담체를 주입한 실험 기간 동안에는 Seilsponge 회사에서 제공하는 직경 0.02 m 정방형의 폴리우레탄 담체 10개를 별도로 주입하였다. 담체의 함수율, pH, 부피밀도, 공극율 및 표면적은 각각 5,700% (w/w), 7.0, 0.015 g/cm³, 98.9% (v/v) 및 76.8 m²/g이었다. 담체가 위로 부상하지 않도록 반응조 중간 지점에 아크릴로 제작한 거름망 구조물을 장착하였다. 기질의 pH는 2 N NaOH 용액과 3 g/l의 NaHCO₃를 이용하여 7-8로 조절하였다. 반응조의 온도는 인큐베이터를 이용하여 35°C로 유지하였다. HRT는 48시간에서 약3일의 적응기간을 두었고, 점차 12시간 및 8시간으로 단축시켰다. HSBR 및 M-HSBR의 운전방법은 HRT 12시간 기준으로, 유입(5분), 반응(200분), 침전(30분) 및 배출(5분) 순서로 총 240분/1회이며, 운전주기는 하루

에 6회이었다.

M-HSBR의 운전 종료 후, 담체 외부, 내부 부착바이오매스 및 반응조 내 부유바이오매스 수소생산특성을 관찰하기 위해, 반응조 내 담체를 취하여 동일한 유입기질 50 ml가 담긴 실린지를 이용하여 표면에 부착된 바이오매스를 수 회 탈리시켰다(담체 외부 부착바이오매스). 표면의 부착 바이오매스가 탈리된 담체를 4등분하여 50 ml 유입기질을 포함하고 있는 플라스틱 튜브에 넣고 10분간 진동시켜 내부에 부착된 바이오매스를 탈리시켰다(담체 내부 부착바이오매스). 상기 부착바이오매스가 포함된 유입기질을 100 ml 시험병에 넣고 하룻동안 회분식 수소발생을 관찰하였다. M-HSBR 반응조 내 부유액 10 ml를 유입기질 50 ml가 담긴 동일한 시험관에 넣고 반응을 관찰하였다(부유바이오매스). 시험관의 상부를 질소로 5분간 퍼징한 후, 고무마개로 막고 30 ml 가스 실린지 4개를 마개에 장착하여 발생하는 가스량을 측정하였다. 35°C 인큐베이터에서 자력교반하였고, 재현성을 위해 2회 반복 실험하였다.

담체가 기질 내 유기물을 흡착하는 현상을 조사하기 위해 새 담체를 50 ml의 유입기질(혼합폐기물)이 담긴 100 ml 시험병에 넣고, 1일간 인큐베이터에서 교반시키면서 반응시켰다. 담체를 넣지 않은 실험을 대조군으로 실험하였고(2회 반복), 운전 종료 후, 각 유출수 내 유기물의 화학적산소요구량(Chemical oxygen demand, COD)을 측정하여 비교하였다.

수소함량은 capillary 컬럼(30 m × 0.32 ID mm × 0.45 OD mm, Agilent, CP-Molsieve 5A)이 장착된 가스크로마토그래피(Agilent Technologies, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때, 오븐, 주입구 및 검출기 온도는 각각 50, 80 및 120°C이었고, 분당 3 ml의 헬륨을 유동상으로 사용하였다. 연속 및 회분식 실험에서 시료에 대한 COD 농도는 COD kits (HACH Co., USA)와 분광광도계(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 이용하여 측정하였고, VSS 및 VS는 Standard methods [1]를 따라 분석하였다.

Fig. 1에 운전시간대별 유입기질과 유출수의 pH, HRT, 가스함량 및 가스발생량을 나타내었다. 초기 운전단계에서 유입수 pH가 8 정도인 반면, 유출수(반응조 내) pH가 6 이하로 다소 낮았다. HRT를 12시간 및 6시간으로 낮추었을 때, pH가 상승하였는데 이는 수소 및 유기산 생성반응이 약화되면서 동시에 유입기질의 높은 pH가 반응조 상태에 영향을 준 것으로 사료된다. 수소생성효율을 증대시키기 위해 HRT를 다시 증가시켰으나, 바이오가스 내 수소함량은 20% 이하로 낮게 측정되었고, 운전 말기에는 수소가 거의 검출되지 않았다. 반응조 정지 후, 내부를 관찰한 결과, 바이오매스 대부분이 유실되었다. 침전된 슬러지층에서 꾸준히 가스가 발생하였고, 이 가스로 인해 반응조 침전성분이 부상하였다. 반응조 재운전을 위해 우선, 외부로 유출된 바이오매스를 회수

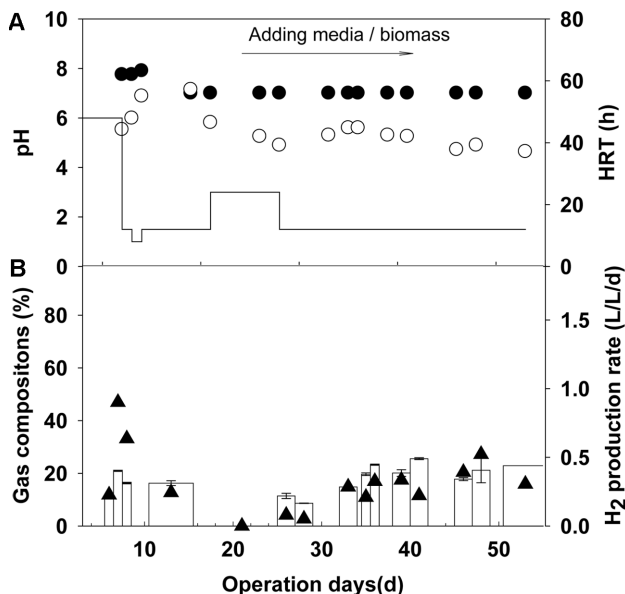


Fig. 1. pH, HRT and hydrogen content and hydrogen production rate in HSBR. (A) ● influent pH, ○ effluent pH, — HRT, (B) □ H₂ composition, ▲ H₂ evolved.

하여, 초기 식중바이오매스와 함께 혼합하여 반응조에 공급하였다. 담체를 이용한 부착미생물막을 적용하기 위해 반응조 내 10개의 폴리우레탄 담체를 주입하였다. 초기 HRT를 24시간으로 조정하여 운전한 후, 12시간으로 단축시켰다. 유출수 pH는 4.5-5.0 정도로 유지되었고, 수소함량 및 수소발생속도는 각각 20%, 0.4 L-H₂/l/d로 안정적이었다. 본 연구에서 수소발생속도가 다른 연구자들에 의한 연구결과보다 다소 낮게 나타났는데 이는 수소발생속도는 대상 폐기물의 종류에 따라 서로 다른 값을 나타내기 때문이다. 당밀폐수만 사용한 경우는 0.8-3.6 L-H₂/l/d, 음식물쓰레기와 하수슬러지를 병합 처리한 경우는 0.48-2.03 L-H₂/l/d로 보고되었다 [8, 14]. 각 폐기물 내에 존재하는 미생물의 종류뿐만 아니라, 공정에서 적용하는 미생물 군집구조가 다를 것으로 판단된다.

Fig. 2에는 HSBR과 M-HSBR 운전 기간 중, 동일한 HRT 조건(12시간)에서 침전시간대별 반응조 내 슬러지층의 높이 변화를 나타내었다. 담체를 주입하고 운전하였을 때 침전 시간 1분이 경과하자 슬러지층의 높이가 급격히 감소하여 3 cm 가 되었다. 반면, 담체를 주입하지 않은 경우, 슬러지층의 높이는 완만하게 감소하였고, 3분 이후에는 감소폭이 크게 떨어져 거의 일정하게 유지되었다. 침전기간 중, 발생가스에 의해 채부유하는 바이오매스가 반응조 중간에 위치한 담체층에 흡착된 것으로 판단된다. 따라서, 담체를 주입한 상황에서 상대적으로 슬러지 침전성이 양호하게 나타날 수 있었다. Jo 등(2008)은 폴리우레탄 담체를 실린더형태의 상향류식 고정상 반응조에 투입하여 글루코스로부터 수소를 생산하는

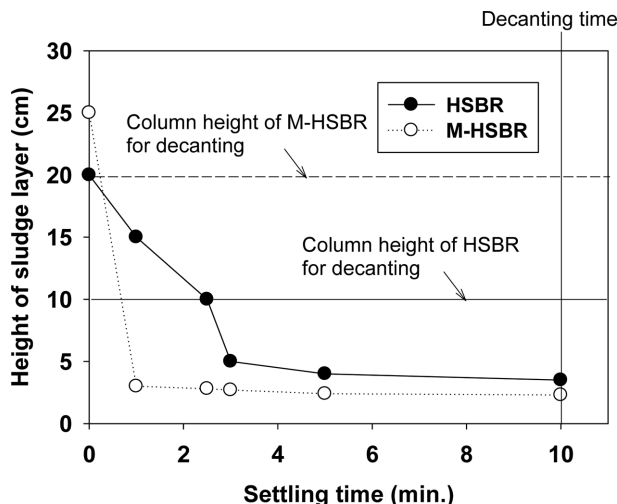


Fig. 2. Height of sludge layer in HSBR and M-HSBR.

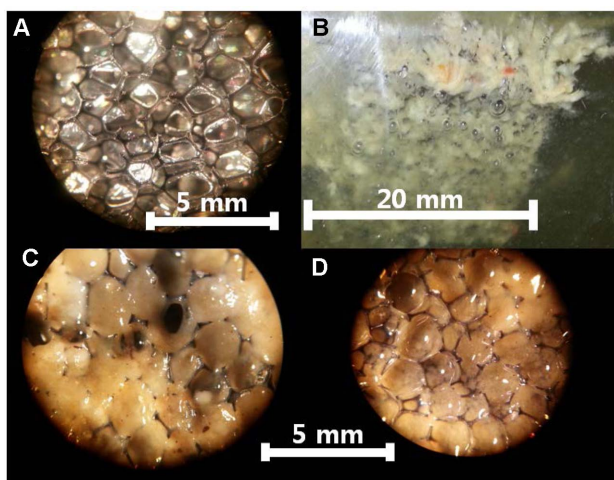


Fig. 3. Polyurethane carrier before operation (A), carrier during operation (B), surface of carrier after operation (C), a cross section of carrier after operation (D).

연구를 하였다[7]. HRT를 24시간에서 1시간으로 단축시키면서 수소를 발생시켰으며, HRT를 1시간으로 단축시켰음에도 불구하고 반응조 외부로 미생물이 유실되지 않았다. Wu 등(2008)은 HRT 4시간에서 CSTR을 운전했을 때, 미생물이 유실함으로써, 반응조 내 바이오매스량이 1.63 g VSS/l로 아주 낮았다. 반면, 분말활성탄을 이용하여 미생물을 고정했을 때는 바이오매스량이 10.3 g VSS/l로 상대적으로 높았고, 그에 따라 수소발생속도도 증가하였다[18]. 비록 본 연구에서 적용된 반응조의 형태가 달랐지만 미생물을 담체에 고정화시켰으므로, 짧은 HRT에서도 안정적인 수소생산을 달성할 수 있었다.

Fig. 3에는 실험에 사용한 폴리우레탄 담체의 운전 전, 후

Table 1. Comparison of hydrogen production by positional differences of microbes in M-HSBR.

Biomass from positional differences	H ₂ production rate (ml-H ₂ /g VSS/d)	H ₂ yield (ml-H ₂ /g VS _{fed})	Biomass (g)	Biomass composition among total biomass in M-HSBR (%)
Attached biomass on carrier	133 ± 10	42.3 ± 2.2	3.50 ± 0.3	29.2
Attached biomass inner carrier	95 ± 14	33.1 ± 0.3	2.33 ± 0.5	19.4
Suspended biomass in reactor	241 ± 4	74.3 ± 0.1	6.15 ± 0.2	51.4

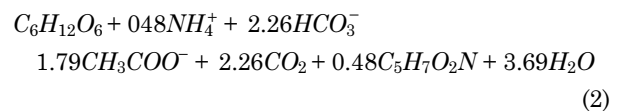
의 모습들을 나타내었다. Fig. 3(A)는 새 담체, (B)는 운전 중 담체, (C)는 운전 종료 후, 담체 표면 외부(200배 확대), (D)는 담체 내부의 모습(200배 확대)이다. 운전 중의 담체 표면에서 부착미생물과 공극에서 발생하는 기포, 즉, 바이오가스의 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 담체 외부에서 상대적으로 두껍게 부착된 고형물층을 관찰하였다.

Table 1에는 M-HSBR 반응조 내에서 바이오매스 위치별 수소발생특성을 나타내었다. 바이오매스 분포 위치는 담체 표면, 내부 및 반응조 내 부유하는 지점으로 크게 3군데이다. 실험 종료 후, 담체를 회수하여 담체 표면 부착 및 내부 바이오매스를 확보하였고, 부유바이오매스는 반응조 내 정지된 슬러지 층에서 수확하였다. 회분식 실험을 통해 비수소생 산속도 및 수소생산수율을 측정하여 비교하였다. 실험결과, 부유바이오매스에 의한 비수소생산속도가 241 ± 4 ml-H₂/g VSS/d로서 가장 높게 나타났고, 이어서 담체 표면 부착바이오매스(133 ± 10 ml-H₂/g VSS/d), 담체 내부 부착바이오매스(95 ± 14 ml-H₂/g VSS/d) 순서로 나타났다. 수소생산수율 역시, 동일한 순서로 나타났다. 담체 부착바이오매스에는 슬러지 체류시간이 상대적으로 길어서 수소생성미생물 외에 중속영양미생물이 다량 존재할 것으로 예상된다. 담체 부착미생물 중, 수소생성미생물의 빠른 성장 및 생물막 탈리 현상으로 인해 부유성 바이오매스에서 수소생성활성이 높았던 것으로 사료된다. 하지만, 구체적인 원인 분석은 미생물 균집 분석을 통해 가능하다고 판단된다.

회분식 실험을 통해 산출한 담체 부착바이오매스량을 M-HSBR 반응조 전체에 적용하여, 반응 종료 시점을 기준으로 반응조 내 위치별 바이오매스량 및 구성비율을 나타내었다 (Table 1). 반응조 내 부유바이오매스량은 6.15 ± 0.21 g VSS로 가장 높았고, 담체 표면 부착바이오매스량과 내부 부착바이오매스량은 각각 3.50 ± 0.3 및 2.33 ± 0.5 g VSS로 상대적으로 낮았다. 반응조 내 총 바이오매스량 중에서 부유바이오매스량이 차지하는 비율은 51.4%이었다. 수소발생특성을 동시에 비교해보면, 미생물 균집 위치별 반응조 활성화와 바이오매스량 구성비율이 서로 비례하는 것을 알 수 있다.

M-HSBR의 유기물(COD) 질량수지에서, 유입 COD 부하량은 유입유량 및 유입기질 농도를 이용하여 산출하였다 (70.3 g COD/d). 유출수의 COD 양은 반응조에서 고액분리

되어 배출되는 상등액의 유량 및 COD 농도를 측정하여 계산하였다(65.1 g COD/d). 한편, 식 (1)에 근거하여 글루코스 192 g COD가 2 mol의 아세트산(128 g COD)으로 분해될 때 제거되는 유기물 단위 질량당 수소발생량은 0.7 L이다. 반면에 암모늄이온을 질소원으로 사용하여 세포합성을 포함할 경우, 식 (2)를 이용할 수 있다. 세포 호흡에 소비된 유기물량은 유기물 단위 질량당 수소발생량 계수(0.58 L-H₂/g COD/d)를 실제 수소발생량(0.59 L/d)으로 나누어 구할 수 있다 (1.03 g COD/d). 따라서, 반응조 내에서 세포합성 및 담체 부착에 의해 축적되는 양은 유입 유기물량(70.3 g COD/d)에서 부산물에 의한 유출수 내 유기물량(65.1 g COD/d)과 세포 호흡에 의한 유기물량(1.03 g COD/d)을 차감한 4.16 g COD/d이다. 여기에서, 세포성장예 의한 셀 합성에 소비된 COD량은 반응조 축적량 4.16 g COD/d에서 담체에 흡착된 유기물량(1.28 g COD/d, 회분식 실험 결과)을 뺀 값인 2.88 g COD/d이다. 이는 식 (2)를 근거로 한 이론적 세포합성량 (2.77 g COD/d) 대비 3.9% 정도의 오차를 나타낸다.



결론적으로, 수소를 생산하는 HSBR 운전에서, 담체를 주입함으로써, 바이오매스 유실을 방지할 수 있었다. 또한, 반응조 내 부착바이오매스량과 부유바이오매스량은 거의 비슷한 구성비율을 보인 반면, 부유바이오매스의 수소생성활성이 훨씬 높았다. 이는 수소생성미생물의 빠른 성장 및 생물막 탈리에 의해 반응조 내 부유바이오매스의 활성이 높게 나타난 것으로 사료된다.

요 약

폴리우레탄 담체가 혼합폐기물을 이용한 연속식수소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 당밀폐수와 하수슬러지를 혼합하여 연속 회분식 공정에서 발효시켰다. 담체를 넣지 않고 12 h의 수리학적 체류시간으로 운전하였을 때, 대부분의 바

이오매스가 외부로 유실된 반면, 담체를 반응조에 투입하였을 때에는 미생물 유실이 현저히 저감하였다. 또한, 담체를 이용한 경우, 수소생산속도 $0.4 \text{ L-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 로 높게 나타났다. 반응조 내 부유 바이오매스에 의한 비수소생산속도가 $241 \pm 4 \text{ ml-H}_2 \text{ g-VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 로서 담체 표면 부착바이오매스 ($133 \pm 10 \text{ ml-H}_2 \text{ g-VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$) 및 담체 내부 부착 바이오매스에 의한 값 ($95 \pm 14 \text{ ml-H}_2 \text{ g-VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$)보다 높게 나타났다.

Acknowledgments

This study was supported by a National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean Government (MISP) (No. NRF-2012R1A2A2A03046724).

References

1. APHA. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th edn. American Public Health Association, Washington, DC.
2. Chen WH, Sung S, Chen SY. 2009. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *Int. J. Hydrogen Energy* **34**: 227-234.
3. Gadhe A, Sonawane SS, Varma MN. 2013. Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *Int. J. Hydrogen Energy* **38**: 6607-6617.
4. Gue WQ, Ren NQ, Wang XJ, Xiang WS, Meng ZH, Ding J, et al. 2008. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* **33**: 4981-4988.
5. Gundogdu TK, Akboncuk MB, Azbar N. 2013. Biohydrogen production via a novel immobilized cell bioreactor. *Biofuels* **4**: 595-603.
6. Intanoo P, Rangsunvigit P, Namprohm W, Thamprajamchit B, Chavadej J, Chavadej S. 2012. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 1104-1112.
7. Jo JH, Lee DS, Park D, Park JM. 2008. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresour. Technol.* **99**: 6666-6672.
8. Jung KW, Moon C, Cho SK, Kim SH, Shin HS. 2013. Conversion of organic solid waste to hydrogen and methane by two-stage fermentation system with reuse of methane fermenter effluent as diluting water in hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.* **139**: 120-127.
9. Keskin T, Giusti L, Azbar N. 2012. Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture. *Int. J. Hydrogen Energy* **37**: 1418-1424.
10. Kim MS, Lee DY. 2010. Fermentative hydrogen production from tofu-processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium. *Bioresour. Technol.* **101**: S48-S52.
11. Lee M, Hidaka T, Hagiwara W, Tsuno H. 2009. Comparative performance and microbial diversity of hyperthermophilic and thermophilic co-digestion of kitchen garbage and excess sludge. *Bioresour. Technol.* **100**: 578-585.
12. Li J, Li B, Zhu G, Ren N, Bo L, He J. 2007. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). *Int. J. Hydrogen Energy* **32**: 3274-3283.
13. Li M, Zhao YC, Guo Q, Qian XQ, Niu DJ. 2008. Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. *Renew. Energy* **33**: 2573-2579.
14. Park MJ, Jo JH, Park D, Lee DS, Park JM. 2010. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**: 6194-6202.
15. Piemonte V, Paola LD, Chakraborty S, Basile A. 2014. Sequencing batch reactors (SBRs) for BioH₂ production: Reactor operation criteria. *Int. J. Hydrogen Energy* In Press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.075>.
16. Ren N, Li J, Li B, Wang Y, Liu S. 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *Int. J. Hydrogen Energy* **31**: 2147-2157.
17. Sreethawong T, Chatsirawatana S, Rangsunvigit P, Chavadej S. 2010. Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**: 4092-4102.
18. Wu SY, Hung CH, Lin CY, Lin PJ, Lee KS, Lin CN, et al. 2008. HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *Int. J. Hydrogen Energy* **33**: 1542-1549.